



Pesquisa de aglutininas anti-*Leptospira* spp. em bovinos da Serra da Canastra, Minas Gerais

[Search for anti-*Leptospira* spp. agglutinins in cattle from Serra da Canastra, Minas Gerais]

"Comunicação Breve/Short Communication"

Gabriela Almeida dos **Santos**, Maritssa Corrêa Caetano **Afonso**, Iara de Oliveira **Sousa**,
Antonieta Lourenia **Gomes**, Jandra Pacheco dos **Santos**, Álvaro **Ferreira Júnior***

Curso de Medicina Veterinária Universidade de Uberaba, Uberaba-MG, Brasil.

*Autor para correspondência/Corresponding author: E-mail: alvaroferreirajr@gmail.com

Resumo

O objetivo desse trabalho foi diagnosticar aglutininas anti-*Leptospira* spp. no soro de animais nunca vacinados e criados em uma propriedade da Serra da Canastra, Estado de Minas Gerais, Brasil. A triagem e a titulação foram realizadas por meio da técnica de soroaglutinação microscópica (MAT), utilizando uma bateria de 15 sorovares de *Leptospira* spp. Foram testadas 100 amostras de soro sanguíneos de bovinos leiteiros e de corte. Desse total, 54% (54/100) foram positivos para aglutininas anti-*Leptospira*. Os sorovares mais frequentes entre os bovinos foram Hardjo (43,81%) e Wolffii (38,1%). O maior título diagnosticado foi 1.600 para o sorovar Wolffii, encontrado em uma fêmea bovina adulta assintomática. Os dados sugerem que sorovares patogênicos de *Leptospira* circulam entre bovinos criados na Serra da Canastra, que a transmissão esteja ocorrendo entre os bovinos infectados e, aparentemente, com pouca participação de roedores.

Palavras-chave: bovino; leptospirose; *Leptospira*; sorovares.

Abstract

This study aimed to diagnose anti-*Leptospira* agglutinins in the serum of bovines that have never been vaccinated and were raised at Serra da Canastra in the state of Minas Gerais, Brazil. Screening and titration were performed by the microscopic agglutination test (MAT) using 15 *Leptospira* spp. serovars. A total of 100 serum samples from bovines were tested. From this total, 54% (54/100) were positive for anti-*Leptospira* agglutinins. The two most frequent reactive serovars in the bovines were Hardjo (43.81%) and Wolffii (38.1%). The highest titer diagnosed was 1,600 for the Wolffii serovar, found in an asymptomatic adult female bovine. The data suggests that pathogenic *Leptospira* serovars circulate among bovines raised at Serra da Canastra and the transmission is occurring among infected bovines apparently with little participation of rodents.

Keywords: bovine; leptospirosis; *Leptospira*; serovars.

Introdução

Leptospirose bovina é uma enfermidade infectocontagiosa, de potencial zoonótico, cuja etiologia é a bactéria *Leptospira* spp. Os sinais clínicos mais comuns em bovinos são infertilidade, mortalidade neonatal, abortamento e redução na produção de leite (Santos et al., 2012). A leptospirose pode ser endêmica ou epidêmica e as ocorrências, normalmente, são decorrentes da exposição de hospedeiros à água ou lama contaminadas pela urina de animais portadores renais de leptospirosas, incluindo roedores, bovinos

equinos, cães e suínos (Martins e Lilenbaum, 2017).

A patogenicidade da leptospirose está relacionada aos fatores de virulência do sorovar infectante e a suscetibilidade do hospedeiro (Quinn et al., 2005). O abortamento é a principal manifestação clínica da leptospirose crônica em fêmeas bovinas e comumente o único sinal observado no rebanho (Pellegrin et al., 1999).

O Parque Nacional da Serra da Canastra, localizado no Estado de Minas Gerais foi criado

pelo Decreto Presidencial Nº 70.335 de 03 de abril de 1972. O rebanho bovino dessa região é formado por raças zebuínas e europeias e a produção de queijos tradicionais tem importância para agricultura familiar. Além disso o Queijo Minas Artesanal constitui um Patrimônio Cultural Imaterial (EMATER, 2002; Sertão BRAS, 2017).

Os dados sobre o diagnóstico sorológico de aglutininas anti-*Leptospira* em bovinos na Serra da Canastra são escassos. A vacinação não é praticada em muitas propriedades. A hipótese para tal fato é que o desconhecimento da presença da infecção, por parte dos produtores da agricultura familiar, não promove a conscientização para o controle da leptospirose.

O presente estudo teve como objetivo apresentar dados iniciais do diagnóstico de aglutininas séricas anti-*Leptospira* spp. em bovinos, nunca vacinados, de uma propriedade rural no município de Vargem Bonita, na Serra da Canastra, MG.

Vargem Bonita, localizada na latitude 20°19'36" sul e a uma longitude 46°21'58" oeste, estando a uma altitude de 768 metros, é um município localizado na região da Serra da Canastra, Minas Gerais. Possui uma área de

409,888 km² e um rebanho bovino estimado em 18.600 animais (IBGE, 2016). A propriedade rural estudada tem como principais atividades econômicas a pecuária de leite, destinada a produção de queijo Canastra, e a criação de bovinos. O nível de tecnologia empregado na produção é insatisfatório. Os animais são mestiços, de baixo valor zootécnico, vacinados contra Febre Aftosa e brucelose.

Foi realizada amostragem não probabilística na seleção do produtor, pois a participação no estudo foi voluntária. As amostras de soro sanguíneo dos bovinos desta propriedade foram obtidas do banco de soros do Hospital Veterinário de Uberaba, mediante o interesse do proprietário em diagnosticar leptospirose em seus animais. Na propriedade havia um total de 500 bovinos, os quais foram divididos em quatro grupos de acordo com a idade. A seleção dos animais foi feita de forma não probabilística, respeitando a proporção de 20% dos bovinos de cada grupo para o diagnóstico sorológico (Tabela 1). Coletou-se uma amostra única de sangue venoso, de cada animal da seleção. Após centrifugação, o soro foi armazenado a -20°C até a realização da técnica de aglutinação microscópica (MAT) (Picardeau, 2013).

Tabela 1. Estratificação em quatro grupos dos bovinos de uma fazenda no Município de Vargem Bonita, Serra da Canastra, MG, de acordo com a faixa etária, para pesquisa de aglutininas anti-*Leptospira* spp.

Faixa Etária	Total de bovinos	n	Estratificação (Grupo)
6 – 12 meses	100	20	A
13 – 24 meses	105	21	B
25 – 36 meses	105	21	C
Acima 36 meses	190	38	D
Total	500	100	-

A MAT foi executada no Laboratório de Medicina Veterinária Preventiva, do Hospital Veterinário de Uberaba, Minas Gerais. Foi utilizado um painel com 15 sorovares: Australis, Autumnalis, Bataviae, Bratislava, Canicola, Copenhageni, Djasiman, Grippotyphosa, Hardjo, Hebdomadis, Icterohaemorrhagie, Pomona, Pyrogenes, Tarassovi e Wolffi. As leptospiras foram mantidas em estufa a 28°C, por meio de repiques semanais no meio EMJH, enriquecido com soro estéril de coelho a 10%. Utilizaram-se somente os cultivos puros, móveis, livres de contaminação, ausentes de auto-aglutininas e com quatro a 14 dias de crescimento (Faine, 1999).

Para a de triagem dos bovinos soropositivos, as amostras de soros foram diluídas na

proporção 1:50 em NaCl 0,85%. Em seguida, homogeneizou-se 50 µL de soro (1:50) e 50µL da suspensão de bactérias vivas. Após 90 minutos de incubação a 28°C, a leitura foi realizada em microscópio de campo escuro (Zeiss), em aumento de 100x. Foram considerados reagentes, os soros que apresentaram aglutinação das bactérias em mais de 50% do campo de observação microscópica na diluição 1:100 utilizada no *screening* dos soros (OIE, 2014; Adler et al., 2015). Os soros reagentes na triagem foram submetidos à prova de titulação, na qual o ponto final da reação foi a recíproca da maior diluição do soro, na razão dois, capaz de aglutinar 50% do campo microscópico.

Das 100 amostras de soros testadas 54% (54/100) foram reagentes para um ou mais dos 15 sorovares de *Leptospira* spp. testados na triagem

tendo como ponto de corte o título 100. Os bovinos apresentaram aglutininas contra oito sorovares (Tabela 2).

Tabela 2. Frequência de reagentes ao teste de soroaaglutinação microscópica para o diagnóstico de leptospirose, de acordo com as soroviedades e seus respectivos títulos, em uma propriedade rural no município de Vargem Bonita, Serra da Canastra, MG.

Sorovares	Título de Aglutininas						Total
	100	200	400	800	1600	(%)	
Bratislava	9	1	-	-	-	9,52	10
Djasiman	3	-	-	-	-	2,86	3
Hardjo	21	14	6	4	1	43,81	46
Hebdomadis	3	-	-	-	-	2,86	3
Icterohaemorrhagie	-	1	-	-	-	0,95	1
Pomona	1	-	-	-	-	0,95	1
Tarassovi	1	-	-	-	-	0,95	1
Wolffi	18	14	7	1	-	38,1	40

Em todos os grupos etários dos bovinos, foram diagnosticados animais reagentes para os sorovares Bratislava, Hardjo e Wolffi. Do total de bovinos positivos (n=54), a menor frequência de reagentes foi entre animais com menos de 12 meses (16,7%; 9/54). Na prova de titulação, os sorovares com os maiores títulos de aglutininas anti-*Leptospira* spp. foram Hardjo e Wolffi. Uma única fêmea bovina, assintomática, apresentou o título 1.600 para o sorovar Hardjo.

No presente estudo, a porcentagem de bovinos reagentes no MAT foi 54% (54/100). Utilizando a mesma metodologia de diagnóstico sorológico Campos et al. (2017), no estado do Piauí, encontraram 50,5% (128/253) de soropositivos e Castro et al. (2008), no estado de São Paulo, diagnosticaram 49,4% (4.059/8.216) de fêmeas bovinas em idade reprodutiva reagentes. Embora a leptospirose seja uma enfermidade relacionada a perdas reprodutivas em rebanhos bovinos, ainda se desconhece qual é a amplitude do seu impacto sobre esse setor produtivo no Brasil. Todavia, já se associou soropositividade à leptospirose e a repetição de cio em bovinos (Libonati et al., 2018).

Os sorovares Hardjo e Wolffi (sorogrupo Sejroe) foram os mais encontrados neste estudo e são apontados como os mais frequentes diagnosticados em bovinos no Brasil, sendo estes animais considerados como hospedeiros de manutenção para o sorovar Hardjo (Castro et al., 2008; Sarmiento et al., 2012). Além deles, foi observada em bovinos a ocorrência de reações para os sorovares Bratislava, Djasiman, Hebdomadis, Icterohaemorrhagiae, Pomona e Tarassovi. Esses sorovares são considerados incidentais para

bovinos, e a transmissão indireta está associada ao contato com o meio ambiente contaminado por leptospiros oriundas de espécies silvestres ou de outras espécies domésticas (Castro et al., 2008)

O sorovar Hardjo é um dos mais importantes e mais frequentes nos rebanhos de bovinos leiteiros no Estado de Minas Gerais (Nicolino et al., 2014). A vacinação de bovinos leiteiros, utilizando vacina produzida com sorovar Hardjo autóctone, reduziu os casos de abortos e mastites nos rebanhos, após um período de dois anos de imunizações. Essa prática foi adotada em função de uma possível falha vacinal apresentada pelas bacterinas comerciais (Chiareli et al., 2012).

Os bovinos do presente estudo não eram vacinados e não apresentavam sinais clínicos de aborto ou mastite, todavia a vacinação do rebanho, além da prevenção da leptospirose bovina, tem potencial para proteger os humanos que convivem com os animais e podem se infectar com o sorovar Hardjo (Oliveira et al., 2017). Na Nova Zelândia, dois trabalhadores de uma fazenda de bovinos leiteiros foram diagnosticados com leptospirose causada por esse sorovar. Desde a implantação de esquemas vacinais rigorosos nos rebanhos bovinos, os casos da doença em humanos nesse país foram reduzidos (McLean, 2014). No Brasil, a sorologia realizada em humanos da Amazônia oriental revelou uma prevalência de 32,8% de núcleos familiares com pelo menos um membro soropositivo, com uma frequência do sorovar Bratislava como o mais provável, seguido pelo Hardjo, o qual foi também um dos mais frequentes nos bovinos, sugerindo que estes animais tenham alguma importância na

transmissão desse sorovar para a população humana (Homem et al., 2001).

O sorovar Wolffii foi o segundo mais frequente nos bovinos da propriedade analisada, o que também era esperado visto que ele está listado entre os de maior ocorrência nos rebanhos bovinos leiteiros do Brasil (Sarmiento et al., 2012). No estado de Mato Grosso do Sul a soropositividade para leptospirose atingiu 96,5% dos rebanhos e 98% dos animais, predominando Hardjo e Wolffii, sendo os fatores de risco foram associados a rebanhos de corte, raças zebuínas e criação extensiva (Figueiredo et al., 2009). Nesse contexto, as condições ambientais de uma determinada região parecem influenciar os fatores de risco para a leptospirose bovina, embora não modifiquem o perfil de frequência dos sorovares diagnosticados nos rebanhos.

A fauna da Serra da Canastra é exuberante e inclui diversos mamíferos (IBAMA, 2005). Já foram detectadas aglutininas contra leptospirosas patogênicas, em capivaras, para os seguintes sorovares: Hardjo, Bratislava, Djasiman, Icterohaemorrhagiae e Grippotyphosa (Langoni et al., 2016). Considerando a crescente importância dos animais silvestres na epidemiologia da leptospirose, os canídeos selvagens são susceptíveis a Hardjo, Wolffii e Icterohaemorrhagiae, entre os sorovares de leptospirosas patogênicas para bovinos (Rodrigues et al., 2015).

Os títulos 100, 200, 400, no MAT, podem corresponder ao início de infecção, infecção prévia ou resposta vacinal (Picardeau, 2013). O título mais alto, encontrado no presente estudo, foi 1600 para o sorovar Hardjo em um único bovino adulto. Este animal apresentou-se assintomático no período da coleta de sangue e não era vacinado. Nesse contexto, este título pode sugerir infecção prévia ou convalescência. De acordo com o estudo de Hashimoto et al. (2012), os fatores de risco associados à leptospirose bovina, causada pelo sorovar Hardjo, incluem exploração de corte, ter mais de 43 bovinos no rebanho, contato com equinos, compra e venda de animais. De maneira adicional, o sinal clínico de aborto não foi uma variável associada à infecção pelo sorovar Hardjo (Hashimoto et al., 2012).

Os resultados encontrados nesse estudo sugerem a circulação de estirpes patogênicas de *Leptospira* spp. nos bovinos criados na Serra da Canastra, Minas Gerais. Os sorovares Hardjo e Wolffii foram os mais frequentes nos bovinos. Os

dados sugerem que sorovares patogênicos de *Leptospira* circulam entre bovinos criados na Serra da Canastra e que a transmissão, possivelmente, esteja ocorrendo entre os bovinos infectados e, aparentemente, com pouca participação de roedores.

Conflito de interesse

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

Comitê de Ética

As amostras de soros utilizadas neste estudo foram escolhidas por conveniência, e são provenientes do banco de soros do laboratório de Medicina Veterinária Preventiva da Universidade de Uberaba, o qual presta serviços de diagnóstico sorológico à comunidade externa à universidade, incluindo propriedades localizadas na Serra da Canastra, Minas Gerais.

Referências

- Adler B. **Leptospira and leptospirosis**. 1st ed. Berlin: Springer, 2005. 293p.
- Campos, Â.P.; Miranda, D.F.H.; Rodrigues, H.W.S.; Lustosa, M.S.C.; Martins, G.H.C.; Mineiro, A.L.B.B.; Castro, V.; Azevedo, S.S.; Silva, S.M.M.S. Seroprevalence and risk factors for leptospirosis in cattle, sheep, and goats at consorted rearing from the State of Piauí, northeastern Brazil. **Tropical Animal Health and Production**, 49(5): 899-907, 2017.
- Castro, V.; Azevedo, S.S. De; Gotti, T. B.; Batista, C. S. A.; Gentili, J.; Moraes, Z. M.; Souza, G. O.; Vasconcellos, S.A.; Genovez, M.É. Soroprevalência da leptospirose em fêmeas bovinas em idade reprodutiva no estado de São Paulo, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, 75(1): 3-11, 2008.
- Chiareli, D.; Cosate, M.R.V.; Moreira, E.C.; Leite, R.C.; Lobato, F.C.F.; Silva, J.A. da; Teixeira, J.F.B.; Marcelino, A.P. Controle da leptospirose em bovinos de leite com vacina autógena em Santo Antônio do Monte, Minas Gerais. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 32(7): 633-639, 2012.
- EMATER. Secretaria de Estado de Agricultura, Pecuária e Abastecimento **Relatório de atividades**. 2002. Disponível em: <http://emater.mg.gov.br/doc/site/AEmatermg/Relat%C3%B3riodeatividades2002.pdf>. Acesso em: 11 nov. 2017

- Faine, S.; Adler, B.; Bolin, C.; Perolat, P. **Leptospira and leptospirosis**. 2. ed., Melbourne: MedSci, 1999. 272p.
- Figueiredo, A.O.; Pellegrin, A.O.; Gonçalves, V.S.P.; Freitas, E.B.; Monteiro, L.A.R.C.; Oliveira, J.M.de; Osório, A.L.A.R. Prevalência e fatores de risco para a leptospirose em bovinos de Mato Grosso do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 29(5): 375-381, 2009.
- Hashimoto, V.Y.; Dias, J.A.; Spohr, K.A.H.; Silva, M.C.P.; Andrade, M.G.B.; Müller, E.E.; Freitas, J.C. Prevalência e fatores de risco associados à *Leptospira* spp. em rebanhos bovinos da região centro-sul do estado do Paraná. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 32(2): 99-105, 2012.
- Homem, V. S. F.; Heinemann M.B.; Moraes Z.M.; Vasconcellos S.A.; Ferreira F.; Ferreira Neto J.S. Estudo epidemiológico da leptospirose bovina e humana na Amazônia oriental brasileira. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 34(2): 173-180, 2001.
- IBAMA. Ministério do Meio Ambiente. **Parque Nacional da Serra da Canastra. Consórcio da Usina Hidrelétrica de Igarapava. 2005**. Disponível em: <http://www.icmbio.gov.br/portal/images/stories/imgs-unidades-coservacao/pm_parna_serra_canastra_1.pdf>. Acesso em: 11 nov. 2017.
- IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Cidades: Minas Gerais: Vargem Bonita**. 2016. Disponível em: <<http://cod.ibge.gov.br/2W34C>>. Acesso em: 25 out. 2017.
- Langoni, H.; Kuribara, I.Y.; Correa, A.P.F.L.; Ullmann, L.S.; Sánchez, G.P.; Lucheis, S.B. Anti-leptospirosis agglutinins in Brazilian capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*). **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, 22(4), 2016.
- Libonati, H.A.; Santos, G.B.; Souza, G.N.; Brandão, F.Z.; Lilenbaum, W. Leptospirosis is strongly associated to estrus repetition on cattle. **Tropical Animal Health and Production**, 50(7). 1625-1629, 2018.
- Martins, G.; Lilenbaum, W. Control of bovine leptospirosis: Aspects for consideration in a tropical environment. **Research in Veterinary Science**, 112: 156-160, 2017.
- McLean, M.; Ruscoe, Q.; Kline, T.; King, C.; Nesdale, A. A cluster of three cases of leptospirosis in dairy farm workers in New Zealand. **The New Zealand Medical Journal**, 127(1388): 13-20, 2014.
- Nicolino, R.R.; Lopes, L.B.; Rodrigues, R.O.; Teixeira, J.F.B.; Haddad, J.P.A. Prevalence and spatial analysis of antileptospiral agglutinins in dairy cattle – Microregion of Sete Lagoas, Minas Gerais, 2009/2010. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 66(3): 648-654, 2014.
- Oliveira, M.A.A.; Leal, É.A.; Correia, M.A.; Serufo Filho, J.C.; Dias, R.S.; Serufo, J.C. Human leptospirosis: occurrence of serovars of *Leptospira* spp. in the state of Minas Gerais, Brazil, from 2008 to 2012. **Brazilian Journal of Microbiology**, 48(3): 483-488, 2017.
- Pellegrin A.O.; Guimarães P.H.S.; Sereno J.R.B.; Figueiredo J.P.; Lage A.P.; Moreira E.C.; Leite R.C. Prevalência da leptospirose em bovinos do Pantanal Mato-Grossense. Corumbá: Embrapa Pantanal-Comunicado Técnico, 1999. 9p.
- Picardeau, M. Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. **Médecine et Maladies Infectieuses**, 43: 1-9, 2013.
- Quinn, P. J.; Markey, B.K.; Carter, M.E.; Donnelly, W.J.; Leonard, F.C. Espiroquetas. In: ____ **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas**. Porto Alegre (RS): Artmed. 2005. p. 179-188.
- Rodrigues, T.C.S.; Santos, A.L.Q.; Lima-Ribeiro, A.M.C.; Lemos, F.G.; Azevedo, F.C.; Arrais, R.C.; Gomes, D.O.; Tavares, T.C.F. Occurrence of antibodies against *Leptospira* spp. in free-ranging wild canids from the Brazilian savanna. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 35(8): 734-740, 2015.
- Santos, J.P.; Lima-Ribeiro, A.M.; Oliveira, P.R.; dos Santos M.P.; Ferreira, A. Jr.; Medeiros, A.A.; Tavares, T.C. Seroprevalence and risk factors for Leptospirosis in goats in Uberlândia, Minas Gerais, Brazil. **Tropical Animal Health and Production**, 44(1): 101-106, 2012.
- Sarmiento, A.M.C.; Azevedo, S.S.; Moraes, Z.M.; Souza, G.O.; Oliveira, F.C.S.; Gonçalves, A.P.; Miraglia, F.; Vasconcellos, S.A. Emprego de estirpes *Leptospira* spp. isoladas no Brasil na microtécnica de soroaglutinação microscópica aplicada ao diagnóstico da leptospirose em rebanhos bovinos de oito estados brasileiros. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 32(7): 601-606, 2012.

Sertão BRAS, 2017. **Rebanho da Serra da Canastra.** Disponível em: <<http://www.sertaobras.org.br/enciclopedia/rebanho-da-serra-da-canastra/>> Acesso em: 25 out. 2017.

WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH (OIE), 2014. **In: Manual of**

diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. Disponível em: <http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.01.12_LEPTO.pdf>. Acesso em: 14 nov. 2018.